



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2011년10월31일
(11) 등록번호 10-1077916
(24) 등록일자 2011년10월24일

(51) Int. Cl.

A61K 36/899 (2006.01) A61K 31/215 (2006.01)

A61K 31/35 (2006.01) A61P 3/04 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0038389

(22) 출원일자 2010년04월26일

심사청구일자 2010년04월26일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020080021127 A

JP2006306747 A

JP10095732 A

KR1020110026271 A

전체 청구항 수 : 총 6 항

(73) 특허권자

한국원자력연구원

대전 유성구 덕진동 150-1

(72) 발명자

정병엽

전라북도 고창군 고창읍 읍내리 650-7

김진홍

전라북도 정읍시 상동 엘트수목토 105동 1302호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이원희

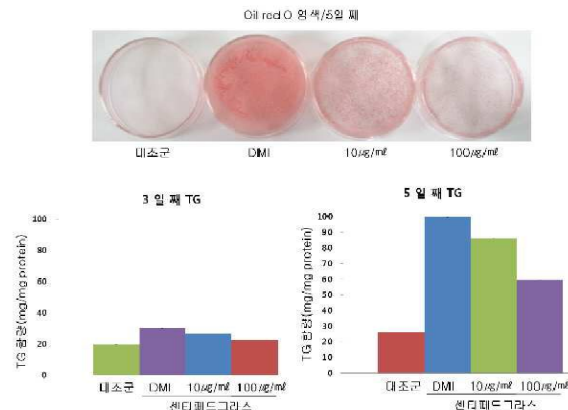
심사관 : 정세준

(54) 센티페드그라스 추출물을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 센티페드그라스(*Eremochloa ophiuroides*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 또는 치료용 조성물 또는 기능성 식품에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 센티페드그라스 추출물은 세포독성이 없고, 지방 생성에 관련된 단백질의 발현을 억제하여 지방세포에서 지방의 축적을 효과적으로 억제하였으므로 비만 예방 또는 치료용 조성물 또는 기능성 식품으로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도4



(72) 발명자

이승식

전라북도 정읍시 시기3동 100 센트럴카운티 105동 1004호

안병철

경상남도 진주시 상대동 현대아파트 104동 202호

이은미

전라북도 익산시 남중동 1가 48-45

김태훈

대구광역시 북구 동천동 부영E그린 206동 907호

이인철

대구광역시 북구 동천동 890번지 동화골든빌 109동 1108호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 523330-10

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관

연구사업명 주요사업(기관고유사업)

연구과제명 방사선 세포배양 및 유용물질 생산 연구

기여율

주관기관 한국원자력연구원

연구기간 2010년 01월 01일 ~ 2010년 12월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

센티페드그라스(*Eremochloa ophiuroides*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 센티페드그라스 추출물은 물, C₁~C₄의 알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 C₁~C₄의 알코올은 메탄올 또는 에탄올인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 4

센티페드그라스 추출물을 유효성분 함유하는 비만 예방 또는 개선용 기능성 식품.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 센티페드그라스 추출물은 물, C₁~C₄의 알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출되는 것을 특징으로 하는 기능성 식품.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 C₁~C₄의 알코올은 에탄올인 것을 특징으로 하는 기능성 식품.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 식물 추출물을 함유하는 항비만 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 비만은 에너지 소모량에 비하여 에너지 섭취량이 많아서 체내에 과잉된 에너지가 지방으로 축적된 상태를 말하며, 2005년 국민건강영양조사에 의하면 우리나라 20세 이상 성인의 31.8%가 비만인 것으로 나타나 1995년도의 14.8%에 비하여 10년 동안 두 배 이상으로 증가되었다(Ministry of Health & Welfare, 2006. The third Korea National Health and Nutrition Examination Survey). 이러한 증가 추세에 따라 비만으로 인한 사회경제적 손실은 2001년도에 1조7천억원에서 매년 증가되고 있으며 정부의 국민건강 증진종합계획에서는 2010년까지 성인 비만율을 30% 수준으로 유지하는 것을 주요 목표로 설정하고 있다(보건복지부, 2005. 국민건강증진종합계획. p 61-64). 비만은 그 자체가 갖는 문제점뿐만 아니라, 심혈관계 질환이나 당뇨, 호흡기 질환, 골관절염 같은 질병을 유발할 수 있기 때문에 전 세계적으로 비만에 많은 관심이 모아지고 있으며(Antipatis V. J. *et al.*,

2001, Obesity as a global problem. In International textbook of obesity. Per Bjorntorp, ed. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK. p3-22), 세계보건기구(World Health Organization, WHO)에서는 비만을 세계적인 영양문제로 다루어 건강을 해치는 단순 위험인자가 아닌 치료해야 할 질병으로 인식하고 있다(World Health Organization. 1998. Obesity: Preventing and managing the global epidemic. Report of WHO Consultation on Obesity, Geneva). 비만은 에너지의 과다 섭취, 운동부족뿐 아니라 신경계 분비적 요인, 약물원인, 유전적 요인 등이 복합적으로 작용하므로 비만을 개선하기 위한 방법으로는 식사, 운동, 행동 요법이나 약물 치료 등이 쓰이고 있다.

[0003] 최근에는 부작용이 없는 식품 및, 천연물로부터 비만 치료제의 개발을 위한 연구가 진행되고 있다. 천연물을 활용한 항비만 소재 개발에 관한 결과를 살펴보면 작용기전 별로 식욕억제에 관여하는 물질로서 히드록시시트릭산(hydroxycitric acid; HCA), 올리브라(Olibra), 치커리, 이눌린 등의 식이섬유 등이 있으며, 지방의 소화 및 흡수를 저해하는 물질로서 키토산, 플라보노이드(flavonoids) 등이 있다. 열 발생을 유도하여 지방 축적을 억제하는 물질로서 고추의 캡사이신(capsaisin), 녹차의 카테킨(catechin), 레티노익산 등이 있고, 지질대사를 조절하는 L-카르니틴(L-carnitine), 융합된 리놀릭산(conjugated linoleic acid; CLA), 우유 칼슘과 관련 단백질 등이 보고되어 있다. 생약재로는 지실, 양하, 결명자, 녹차, 소나무 잎, 괴화, 천궁, 오수유 등이 체중조절에 효과가 있다는 결과가 보고되었다(Kim M. H., 2004, Korean J. Health Psychol. 9:493-509, Reddy P. et al., 1998, Formulary 33:943-959, Burns A. A. et al., 2002, Eur. J. Clin. Nutr. 56:368-377, Delzenne N. M. et al., 2005, Br. J. Nutr. 1:157-161, Zacour A. C. et al, 1992, J. Nutr. Sci. Vitam. 38:609-613, Griffiths D. W. et al., 1986, Adv. Exp. Med. Biol. 1999:509-516). 따라서 소비자들은 이와 같은 부작용이 적으며, 반대로 약효가 뛰어난 자연소재 비만치료제에 더 많은 관심을 가지고 있으며, 이러한 요구에 부응하고자 안전하고 효능이 우수한 천연약제의 개발이 요망되고 있는 실정이다.

[0004] 센티페드그라스(*Eremochloa ophiuroides*)는 생육이 늦은 난지형 잔디로서 뗏장을 형성하며 포복 생장을 하는 다년생 잔디이다. Poaceae과에 속하며, 학명은 *Eremochloa ophiuroides* (Munro) Hack이다. 주로 중국과 동아시아, 인도차이나, 미국 북동부, 메소아메리카와 캐리비안 지역에 분포하고 있으며, 각종 토양조건에 폭 넓게 잘 적응되지만, 특히 습하며 산성토양 및 비옥도가 낮은 사질 토양에서 잘 견딘다.

[0005] 형태학적 특징으로서, 잎은 길이 15~30 mm, 폭 2~4 mm이고, 흰 중심맥(mid vein)을 가지는 납작한 모양이며, 경령(collar) 부분을 제외하고 털이 없고, 잎 끝부분은 둥글다. 줄기는 아주 굳게 다문 잎집(sheath)을 가지고, 뿌리는 가는 분기형의 포복경(stolons)이다. 꽃 부분은 3~5 인치 정도의 하나의 총상화서(總狀花序, raceme, = 총상꽃차례)를 가지고, 상기 총상화서는 자줏빛색을 띠고 약간 평평하며 두 줄로 배열된 작은 이삭(小穗, spikelet)을 가진다. 주용도는 잔디 밭 또는 뗏장 잔디로 사용되고 높은 잎의 비율(leafliness)과 좋은 맛 때문에 조사료로 이용된다. 그러나 센티페드그라스 추출물의 비만에 대한 치료 효과는 전혀 보고된 바 없다.

[0006] 이에 본 발명자들은 지방의 축적을 억제하여 비만 억제 활성을 갖는 천연 식물 추출물을 연구하던 중, 센티페드그라스 추출물이 지방세포에서 지방생성에 관련된 단백질의 발현을 억제시켜 지방의 축적을 억제하는 효과가 있음을 확인하여 비만 예방 또는 치료용 조성물로 유용하게 사용될 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 센티페드그라스(*Eremochloa ophiuroides*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 또는 치료용 조성물, 또는 기능성 식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 센티페드그라스 추출물을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 또는 치료

용 약학적 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 센티페드그라스 추출물을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 또는 개선용 기능성 식품을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 센티페드그라스 추출물은 세포독성 없이 지방세포에서 지방생성에 관련된 단백질의 발현을 억제시켜 지방의 축적을 억제하는 항비만 활성을 가지고 있으므로 비만 예방 또는 치료용 조성물의 유효성분으로서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 센티페드그라스 추출물에 존재하는 2차 대사산물을 동정한 고성능액체크로마토그래피 결과를 나타낸 도이다.

도 2는 센티페드그라스 추출물이 지방세포 생존능에 미치는 영향을 CCK-8 분석을 통해 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 3은 센티페드그라스 추출물이 지방세포의 세포사에 미치는 영향을 LDH 분석을 통해 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 4는 센티페드그라스 추출물이 지방세포의 중성지방 축적에 미치는 영향을 Oil red O 염색 및 트리글리세리드 분석을 통해 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 5는 센티페드그라스 추출물이 지방세포의 지방생성 유도 단백질의 발현에 미치는 영향을 웨스턴 블롯을 통해 확인한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0013] 본 발명은 센티페드그라스(*Eremochloa ophiuroides*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명의 조성물은 센티페드그라스 추출물이 0.1 내지 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 포함되는 것이 바람직하며, 센티페드그라스 추출물이 0.5 내지 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 포함되는 것이 더욱 바람직하며, 센티페드그라스 추출물이 1 내지 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 포함되는 것이 가장 바람직하다.

[0015] 본 발명의 센티페드그라스 추출물은

[0016] 1) 건조한 센티페드그라스를 분말로 만들거나 세절한 후 추출용매를 가하여 추출하는 단계;

[0017] 2) 단계 1)의 추출물을 식힌 후 여과하는 단계; 및

[0018] 3) 단계 2)의 추출물을 감압농축한 후 동결건조하는 단계를 포함하는 제조방법에 의해 제조되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0019] 상기 제조방법에 있어서, 단계 1)의 센티페드그라스는 재배한 것 또는 시판되는 것 등 제한 없이 사용할 수 있다.

[0020] 또한, 본 발명에 따른 센티페드그라스 추출물은 센티페드그라스의 잎, 줄기 및 뿌리 모두 사용가능하며, 센티페드그라스 잎을 사용하여 추출하는 것이 바람직하나 이에 제한되는 것은 아니다.

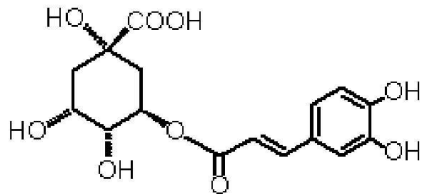
[0021] 상기 제조방법에 있어서, 단계 1)의 추출용매는 물, 알코올 또는 이들의 혼합물인 것이 바람직하고, 상기 알코올로는 C_1 내지 C_4 저급 알코올을 이용하는 것이 바람직하며, 저급 알코올로는 에탄올 또는 메탄올을 이용하는 것이 바람직하고, 메탄올을 이용하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 추출방법으로는 진탕추출

또는 환류추출을 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 상기 추출용매를 건조된 센티페드그라스의 총 분량에 5 내지 15배 첨가하여 추출하는 것이 바람직하며, 10배 첨가하여 추출하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 또한, 추출온도는 25 ~ 120℃인 것이 바람직하며, 40 ~ 45℃인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 추출시간은 3시간 이상이 바람직하며, 24시간이 더욱 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 아울러, 추출 회수는 1 내지 4회인 것이 바람직하며, 2회 반복 추출하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0022] 상기 제조방법에 있어서, 단계 3)의 감압농축은 감압농축기를 이용하는 것이 바람직하고 회전진공농축기를 이용하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 감압농축은 20 ~ 60℃에서 농축하는 것이 바람직하고 45 ~ 55℃에서 농축하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 동결건조는 동결건조기를 이용하는 것이 바람직하고 진동동결건조기를 이용하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 동결건조는 -50 ~ -100℃에서 건조하는 것이 바람직하고 -70℃에서 건조하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0023] 상기 센티페드그라스 추출물은 하기 화학식 1 내지 화학식 5로 기재되는 화합물로 구성된 군으로부터 선택된 화합물들 중 어느 하나 이상을 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다(도 1 참조):

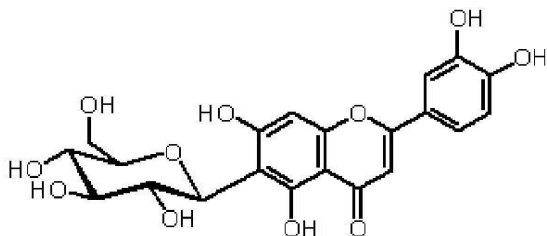
화학식 1



Chlorogenic acid

[0024]

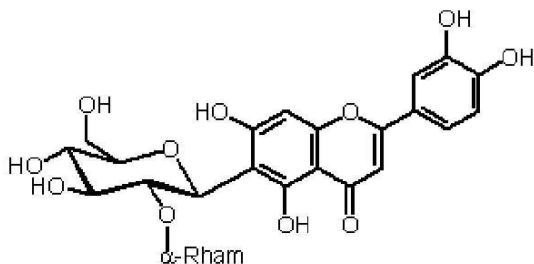
화학식 2



Isoorientin

[0025]

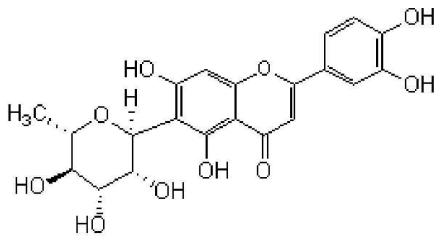
화학식 3



Rhamnosylisoorientin

[0026]

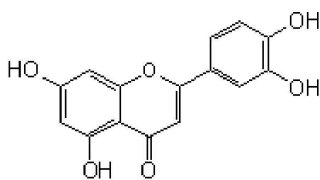
화학식 4



Rhamnosyl-luteolin

[0027]

화학식 5



Luteolin

[0028]

[0029] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명의 센티페드그라스 추출물은 지방세포에 세포 독성을 나타내지 않고(도 2 및 도 3 참조), 지방세포의 중성지방 축적을 억제시켰으며(도 4 참조), 이는 PPAR gamma(Peroxisome proliferator-activated receptor- γ), C/EBP(Emopamil binding protein) alpha, C/EBP beta, Ap2(Activating protein 2)와 같은 지방생성 유도 단백질의 발현을 억제하기 때문(도 5 참조)임을 확인하였다.

[0030] 이에, 본 발명의 센티페드그라스 추출물은 비만의 예방, 개선 또는 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

[0031] 본 발명의 조성물은 상기 성분에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다. 본 발명의 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 센티페드그라스 추출물을 0.0001 내지 10 중량%로, 바람직하게는 0.001 내지 1 중량%를 포함한다.

[0032] 본 발명의 약학적 조성물이 적용될 수 있는 개체는 척추동물이고 바람직하게는 포유동물이며, 그보다 바람직하게는 쥐, 토끼, 기니아피크, 햄스터, 개, 고양이와 같은 실험동물이고, 가장 바람직하게는 침팬지, 고릴라와 같은 유인원류 동물이다.

[0033] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 피부 외용 또는 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사 또는 흉부내 주사 주입방식을 선택하는 것이 바람직하다.

[0034] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 통상적으로 사용되는 부형제, 붕해제, 감미제, 활택제, 향미제 등을 추가로 포함할 수 있다. 상기 붕해제로는 전분글리콜산나트륨, 크로스포비돈, 크로스카멜로스나트륨, 알긴산, 카르복시 메틸셀룰로오스 칼슘, 카르복시 메틸셀룰로오스 나트륨, 키토산, 구아검, 저치환도히드록시프로필셀룰로오스, 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 폴라크릴린 칼륨 등이 있다. 또한, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약제학적으로 허용가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이달실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엿, 아라비아 고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성구산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 텍스트로스, 소르비톨, 탈크 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약제학적으로 허용가능한 첨가제는 상기 약학적 조성물에 대해 0.1~90 중량부 포함되는 것이 바람직하다.

[0035] 경구투여를 위한 고형제제에는 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 연질캡셀제, 환 등이 포함된다. 경구를 위한 액상

제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 에어로졸 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제로는 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 멸균된 수용액, 액제, 비수성용제, 현탁제, 에멀전, 시럽, 좌제, 에어로졸 등의 외용제 및 멸균 주사제제의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 바람직하게는 크림, 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 파스타제 또는 카타플라스마제의 피부 외용 약학적 조성물을 제조하여 사용할 수 있으나, 이에 한정하는 것은 아니다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0036] 본 발명의 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 체내에서 활성성분의 흡수도, 불활성화율 및 배설속도, 환자의 연령, 성별 및 상태, 치료할 질병의 중증 정도에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 경구 투여제의 경우 일반적으로 성인에게 1일에 체중 1 kg당 본 발명의 약학적 조성물을 1일 0.0001 내지 100 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 100 mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0037] 본 발명의 조성물은 비만억제를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0038] 본 발명의 약학적 조성물은 독성 및 부작용은 거의 없으므로 장기간 복용 시에도 안심하고 사용할 수 있는 조성물이다.

[0039] 또한, 본 발명은 센티페드그라스 추출물을 유효성분 함유하는 비만 예방 또는 개선용 기능성 식품을 제공한다.

[0040] 본 발명의 센티페드그라스 추출물은 세포독성이 없고 지방세포에서 지방생성 유도 단백질의 발현을 억제하여 중성지방의 축적을 억제시키므로 비만 예방 또는 개선용 기능성 식품으로 유용하게 사용할 수 있다.

[0041] 본 발명의 센티페드그라스 추출물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 위생)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 본 발명의 센티페드그라스 추출물은 원료에 대하여 15 중량부 이하, 바람직하게는 10 중량부 이하의 양으로 첨가된다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0042] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 본 발명의 센티페드그라스 추출물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 기능성 식품을 모두 포함한다.

[0043] 본 발명의 기능성 식품은 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스 및 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 기능성 식품 100 중량부당 0.01~0.04 중량부, 바람직하게는 약 0.02~0.03 중량부 범위에서 선택하는 것이 바람직하다.

[0044] 상기 외에 본 발명의 기능성 식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 기능성 식품은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 기능성 식품 100 중량부당 0.01~0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0045] 이하, 본 발명을 하기의 실시예 및 제조예에 의하여 더욱 자세히 설명한다.

[0046] 단, 하기 실시예 및 제조예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 제조예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0047] [실시예 1]

[0048] **센티페드그라스 추출물의 제조**

[0049] 센티페드그라스(*Eremochloa ophiuroides*) 종자를 일본의 Fukukaen Nursery and Blub co. Ltd로부터 수입하여 한국원자력연구원 정읍 방사선과학연구소의 포장에서 증식하여 센티페드그라스 잎 시료를 채취하였다. 채취한 잎 시료는 -80℃에 보관하여 사용하였다. 센티페드그라스 잎 5 kg 을 100% 메탄올(MeOH) 20 ℓ 를 첨가하여 믹서기로 마쇄한 후 상온에서 3일간 침지시켜 얻은 추출물을 50℃에서 감압 농축하여 210 g의 센티페드그라스 메탄올 추출물을 수득하였다.

[0050] [실시예 2]

[0051] **센티페드그라스 추출물에 존재하는 유용한 2차 대사산물의 분석**

[0052] 애질런트 고성능 액체 크로마토그래피(Agilent high performance liquid chromatography, HPLC)(Agilent Technological, 미국)를 사용하여 상기 실시예 1에서 수득한 센티페드그라스 메탄올 추출물의 유용한 2차 대사산물을 분석하였다. 컬럼은 Beckman Coulter ULTRASPHERE(5 μm, 4.6 mm×25 cm)을 사용하였고, 컬럼의 온도는 40℃로 조절하였다. 0.1% 트리플루오로아세트산(trifluoroacetic acid)을 포함 한 용액(A)과 0.1% 트리플루오로아세트산(trifluoroacetic acid)을 포함한 50% 아세토나이트릴(acetonitrile) 용액(B)을 이동상으로 하여 HPLC를 수행하였다. 하기 [표 1]에 나타난 이동상 조건에 따라, 50분간 1 ml/min 유속으로 유지하였다.

[0053] 그 결과, 도 1에서 나타난 바와 같이 센티페드그라스 메탄올 추출물에는 유용한 2차 대사산물인 클로로겐산(chlorogenic acid), 이소오리엔틴(isoorientin), 람노실이소오리엔틴(rhamnosyloorientin), 람노실-루테올린(rhamnosyl-luteolin) 및 루틴(퀘세틴-3-O-루티노사이드{rutin(Quercetin-3-O-rutinoside)})이 존재하는 것으로 나타났다.

표 1

[0054]

이동상	A: 0.1% 트리플루오로아세트산(Trifluoroacetic acid, TFA)	
	B: 아세토나이트릴(Acetonitrile) : 물(H ₂ O) = 1 : 1(v/v) in 0.1% TFA	
추출 모드 (구배 조건)	추출 시간	% 이동상 B
	0	20
	18	33
	30	40
	40	40
	42	20
	50	20

[0055] [실시예 3]

[0056] **3T3-L1 세포배양 및 추출물 처리**

[0057] 3T3-L1 지방세포(edipocyte)를 American Type Culture Collection(USA)로부터 구입하였다. 본 실험에 사용한 지방세포 3T3-L1 배양액은 DMEM에 1% 페니실린/스트렙토마이신, 10% FBS를 첨가하여 5% CO₂ 배양기에서 80%로 배양접시에 차도록 배양하여 미분화 지방세포(preadipocyte)가 되면, 지방세포로 분화시키기 위해서 배양액에 100 nM 인슐린, 0.25 μM 덱사메타손(dexametasone), 10 μM 인도메타신(Indomethacin) 그리고 500 μM 이소부틸메틸잔틴(isobutylmethylxanthine)을 섞어서 2일 간격으로 분화 유도 후 6일까지 처리하여 지방세포로 분화시켰다. 그리고 잔디 추출물은 각각 10 μg/ml, 100 μg/ml 농도로 분화 유도와 함께 매일 세포에 처리되었다.

- [0058] [실시예 4]
- [0059] **센티페드그라스 추출물의 세포독성 확인**
- [0060] **<4-1> CCK8 분석**
- [0061] 상기 실시예 1에서 수득한 센티페드그라스 추출물이 세포 증식에 미치는 영향을 확인하고자 Cell Counting Kit-8(CCK-8) 분석을 실시하였다. 세포 배양 배지에 첨가된 테트라졸리움염(tetrazolium salt)은 미토콘드리아의 호흡사슬(respiratory chain)에 존재하며, 생존 세포시에만 활성이 있는 숙신산-테트라졸리움-환원효소(succinate-tetrazolium-reductase)에 의해 포르마잔(formazan)색으로 변환된다. 살아있는 세포수가 증가하면 시료중의 미토콘드리아 탈수소효소(dehydrogenase)의 전체 활성이 증가하여 이 효소활성의 증가가 포르마잔 색소의 생성증가를 유도하기 때문에, 포르마잔 색소와 배지 중의 대사활성이 있는 세포수와는 직선적인 상관관계를 나타내게 된다. 노란색의 수용성 테트라졸리움은 미토콘드리아의 탈수소효소의 작용에 의하여 보라색의 불용성 포르마잔(formazan crystal)으로 환원되며, 이를 O.D.로 측정하여 정량화 한다.
- [0062] 아무것도 처리하지 않거나, 3T3-L1 세포 분화에 동반하여 센티페드그라스 추출물을 농도별(10 또는 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리한 경우 또는 DMI(dexamethasone, 1-methyl-3- isobutylxanthine 및 insulin)를 처리한 경우(대조군)에서 CCK-8 assay reagent (Dojindo Lab)을 50 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 농도로 처리하여 37℃에서 1 내지 4 시간 반응시킨 후 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하고 대조군과의 비교를 통해 세포생존율을 계산하였다.
- [0063] 그 결과, 도 2에서 나타난 바와 같이 본 발명의 센티페드그라스 추출물을 저농도 또는 고농도로 처리하였을 때 지방세포가 대조군과 동일한 생존율을 보여, 세포독성이 없음을 확인하였다.
- [0064] **<4-2> LDH 분석**
- [0065] 상기 실시예 1에서 수득한 센티페드그라스 추출물의 세포독성을 확인하고자 LDH 분석을 실시하였다. LDH 분석은 세포가 사멸되면서 방출되는 효소량을 측정하는 것으로, 세포사가 일어나면서 세포질 내에 존재하는 젖산 탈수소효소(lactate dehydrogenase; LDH)가 배지(media)내로 방출되는 양을 측정하여 세포독성/세포용해를 측정하는 것이다.
- [0066] 아무것도 처리하지 않거나, 3T3-L1 세포 분화에 동반하여 센티페드그라스 추출물을 농도별(10 또는 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리한 경우 또는 DMI를 처리한 경우(대조군)에서 각 샘플 100 μl 을 96 웰 플레이트에 분주하고 LDH assay reagent(ROCHE) 100 μl 을 각 샘플이 있는 96웰에 분주한 다음, 알루미늄 호일에 싸서 실온에서 25분동안 반응시킨 후 ELISA reader로 490 nm에서 흡광도를 측정하고 대조군과의 비교를 통해 세포독성을 계산하였다.
- [0067] 그 결과, 도 3에서 나타난 바와 같이 본 발명의 센티페드그라스 추출물을 저농도 또는 고농도로 처리하였을 때 지방세포의 대조군과 비교한 상대적 세포사가 유의한 차이를 나타내지 않아, 세포독성이 없음을 확인하였다.
- [0068] [실시예 5]
- [0069] **센티페드그라스 추출물의 지방축적 억제활성 확인**
- [0070] **<5-1> Oil red O 염색**
- [0071] 세포내 중성지방의 정도를 측정하기 위하여 60%의 이소프로판올에 0.5%의 Oil red O를 제조하여 0.2 μm 필터로 여과시켜 준비 한 후, 아무것도 처리하지 않거나, 3T3-L1 세포 분화에 동반하여 센티페드그라스 추출물을 농도별(10 또는 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리한 경우 또는 DMI를 처리한 경우(대조군)에서 각 세포를 PBS로 두 번 세척하여 1 ml (60 mm dish)의 oil re O 용액을 15분 동안 실온에서 반응 시킨 후 PBS로 세 번 세척하고서 현미경 관찰하였다.
- [0072] 그 결과, 도 4에서 나타난 바와 같이 대조군에서는 지방 세포가 붉게 염색되었지만, 처리한 센티페드 추출물의 농도가 높을수록 지방세포가 Oil red O로 염색된 정도가 감소되는 것을 확인하였다.

- [0073] <5-2> 트리글리세리드 분석
- [0074] 지방전구세포는 지방세포로 분화하면서 동시에 세포질 내에 중성지방 과립을 축적시킨다. 이때 당질의 흡수와 중성지방의 합성을 증가시키는 등의 복잡한 기전을 통해 지질의 형태로 에너지를 세포내 저장하고, 지질단백질 리파아제(lipoprotein lipase)를 활성화시킴으로써 세포 외부에 존재하거나, 혈액 내에 순환하는 지질단백질에서 유래된 지방산 흡수를 촉진하여 글리세롤과 자유 지방산이 결합하여 생성된 트리글리세롤(triacylglycerol)을 지방 세포 내 지방 과립으로 축적시킨다. 본 발명자들은 인슐린 자극에 의해 미분화 지방세포인 3T3-L1 세포가 지방세포로 분화 할 때 센티페드그라스 추출물에 의한 세포내 지방 과립의 저해 활성을 검토하였다. 3일 또는 5일 간 아무것도 처리하지 않거나, 3T3-L1 세포 분화에 동반하여 센티페드그라스 추출물을 농도별(10 또는 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리한 경우 또는 DMI를 처리한 경우(대조군)에서 중성지방 측정용 kit(ASAN PHAR.CO., LTD)의 중성지방 측정 액 1 ml와 용해 완충액 30 μl 을 첨가한 뒤 37°C에서 30분 반응 시킨 다음 ELISA reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [0075] 그 결과, 도 4에서 나타난 바와 같이 3일 제에서는 대조군과 비교하였을 때, 센티페드그라스 추출물을 처리한 경우와 중성지방 축적량에 큰 차이가 없었으나, 5일 제에서는 대조군과 비교하였을 때, 센티페드그라스 추출물의 처리농도가 높을수록 중성지방 축적량이 현저하게 감소하는 것을 확인하였다.
- [0076] [실시예 6]
- [0077] 센티페드그라스 추출물 처리에 따른 지방세포의 지방생성 유도 단백질의 발현량 확인
- [0078] 본 발명자들은 상기에서 확인한 센티페드그라스 추출물의 지방세포에서 지방 축적 억제효과가 지방생성 유도 단백질의 발현을 억제하여 나타난 결과인지 확인하기 위하여 하기 실험을 수행하였다.
- [0079] 3일 또는 5일 간 아무것도 처리하지 않거나, 3T3-L1 세포 분화에 동반하여 센티페드그라스 추출물을 농도별(10 또는 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리한 경우 또는 DMI를 처리한 경우(대조군)에서 각 세포를 모아 프로테아나제 억제제(1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.1 okadaic acid, 각각 10 /ml 의 aprotinin, leupeptin 및 pepstatin)를 포함하는 용해 완충액(150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 0.2 mM sodium vanadate, 0.5% Nonidet P-40)에 부유시킨 다음 얼음에 30분간 방치한 후 초음파 분해하였다. 상기 각 세포용해물을 2×SDS 정지 완충액(2% SDS, 5 mM EGTA, 5 mM EDTA, 25 mM dithiothreitol, 10% glycerol, 0.01% bromphenol blue, and 0.25 M Tris-Cl, pH 6.8)에 희석시키고 5분 동안 100°C에서 끓였다. 각 세포 용해물에서 동량의 단백질을 10% SDS-PAGE로 분리하고, 니트로셀룰로오스 막으로 이동시켰다. 니트로셀룰로오스 막의 비특이적 항체 결합을 막기 위하여 1시간 동안 블로킹 시킨 다음, PBS 용액으로 2회 세척하였다. 상기 막에 지방생성 유도에 관련된 단백질[PPAR gamma(Peroxisome proliferator-activated receptor- γ), C/EBP(Emopamil binding protein) alpha, C/EBP beta 및 Ap2(Activating protein 2)] 각각에 대한 1차 항체들(PPAR gamma; cell signaling, C/EBPalpha; Cell signaling, Santa Cruze, C/EBPbeta; Santa Cruze, Ap2; Santa Cruze)을 1:100-1:1000의 비율로 희석하고 상온에서 2시간동안 일정한 방향으로 흔들어 주었다. 다시 2-3회 PBS로 세척한 다음 탐식자가 결합된 2차 항체를 같은 비율로 희석하여 상온에서 2시간 동안 반응시킨 후, X-ray 필름에 현상하여 각 단백질의 발현량을 확인하였다.
- [0080] 그 결과, 도 5에서 나타난 바와 같이 3일 제에서는 대조군과 비교하였을 때, 센티페드그라스 추출물을 처리한 경우와 지방생성 유도에 관련된 단백질 발현량에 큰 차이가 없었으나, 5일 제에서는 대조군과 비교하였을 때, 센티페드그라스 추출물의 처리농도가 높을수록 지방생성 유도에 관련된 단백질의 발현량이 현저하게 감소하는 것을 확인하였다.
- [0081] [제조예 1]
- [0082] 센티페드그라스 추출물을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 또는 치료용 약제의 제조
- [0083] <1-1> 시럽제의 제조
- [0084] 본 발명의 센티페드그라스 추출물을 유효성분으로 함유하는 시럽제는 하기 표 2의 조성과 같이 제조하였다.

표 2

구성성분	함량(중량부)
센티페드그라스 추출물	2
사카린	0.8
당	25.4
글리세린	8
향미료	0.04
에탄올	4
소르브산	0.4
증류수	60

<1-2> 정제의 제조

본 발명의 센티페드그라스 추출물을 유효성분으로 함유하는 정제는 하기 표 3의 구성과 같이 제조하였다.

표 3

구성성분	함량(중량부)
센티페드그라스 추출물	250
락토오스	175.9
감자전분	180
콜로이드성 규산	32
10% 젤라틴 용액	5
감자전분	160
활석	50
스테아르산 마그네슘	5

본 발명의 추출물 250 중량부, 락토오스 175.9 중량부, 감자전분 180 중량부 및 콜로이드성 규산 32 중량부와 혼합하였다. 상기 혼합물에 10% 젤라틴 용액을 첨가시킨 후, 분쇄하여 14 메쉬체를 통과시켰다. 이것을 건조하고 여기에 감자전분 160 중량부, 활석 50 중량부 및 스테아린산 마그네슘 5 중량부를 첨가하여 얻은 혼합물을 정제로 제조하였다.

[제조예 2]

센티페드그라스 추출물을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 또는 개선용 기능성 식품의 제조

본 발명의 센티페드그라스 추출물을 유효성분으로 함유하는 식품들을 다음과 같이 제조하였다.

<2-1> 밀가루 식품의 제조

본 발명의 센티페드그라스 추출물 0.5~5.0 중량부를 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하였다.

<2-2> 스프 및 육즙(gravies)의 제조

본 발명의 센티페드그라스 추출물 0.1~5.0 중량부를 스프 및 육즙에 첨가하여 기능성 육가공 제품, 면류의 수프 및 육즙을 제조하였다.

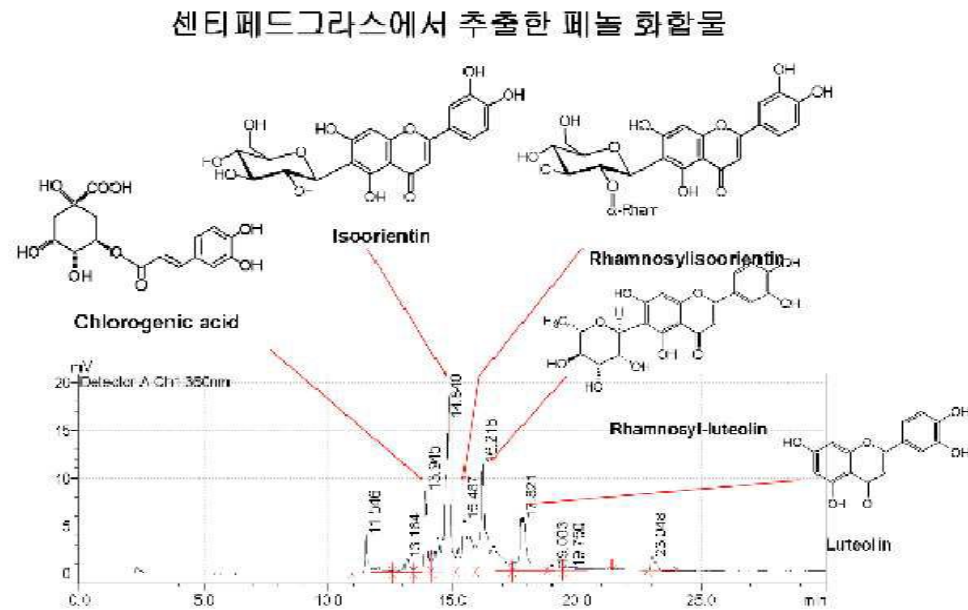
<2-3> 그라운드 비프(ground beef)의 제조

본 발명의 센티페드그라스 추출물 10 중량부를 그라운드 비프에 첨가하여 기능성 그라운드 비프를 제조하였다.

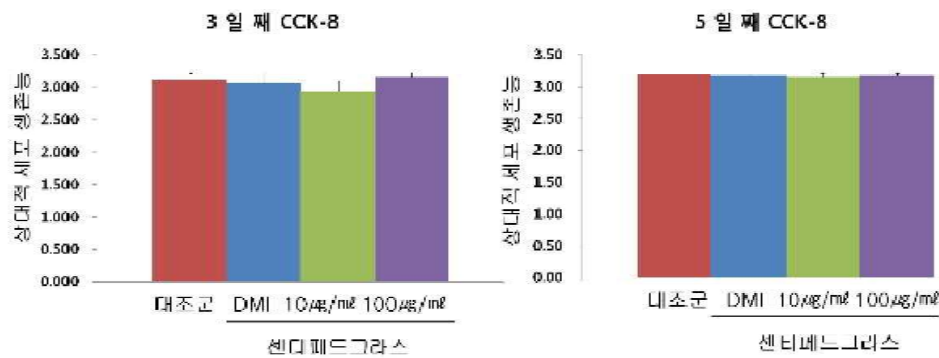
- [0099] <2-4> 유제품(dairy products)의 제조
- [0100] 본 발명의 센티페드그라스 추출물 5~10 중량부를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.
- [0101] <2-5> 전식의 제조
- [0102] 현미, 보리, 찹쌀, 울무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.
- [0103] 검정콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 찌서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.
- [0104] 본 발명의 추출물을 진공 농축기에서 감압농축하고, 분무, 열풍건조기로 건조하여 얻은 건조물을 분쇄기로 입도 60 메쉬로 분쇄하여 건조분말을 얻었다.
- [0105] 상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및 본 발명의 센티페드그라스 추출물을 다음의 비율로 배합하여 제조하였다.
- [0106] 곡물류(현미 30 중량부, 울무 15 중량부, 보리 20 중량부), 종실류(들깨 7 중량부, 검정콩 8 중량부, 검정깨 7 중량부), 본 발명의 센티페드그라스 추출물(3 중량부), 영지(0.5 중량부), 지황(0.5 중량부)
- [0107] [제조예 3]
- [0108] 센티페드그라스 추출물을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 또는 개선용 기능성 음료의 제조
- [0109] <3-1> 건강 음료의 제조
- [0110] 액상과당(0.5%), 올리고당(2%), 설탕(2%), 식염(0.5%), 물(75%)과 같은 부재료와 본 발명의 센티페드그라스 추출물 5 g을 균질하게 배합하여 순간 살균을 한 후 이를 유리병, 팩트병 등 소포장 용기에 포장하여 제조하였다.
- [0111] <3-2> 야채 주스의 제조
- [0112] 본 발명의 센티페드그라스 추출물 5 g을 토마토 또는 당근 주스 1,000 ml에 가하여 야채 주스를 제조하였다.
- [0113] <3-3> 과일 주스의 제조
- [0114] 본 발명의 센티페드그라스 추출물 1 g을 사과 또는 포도 주스 1,000 ml 에 가하여 과일 주스를 제조하였다.

도면

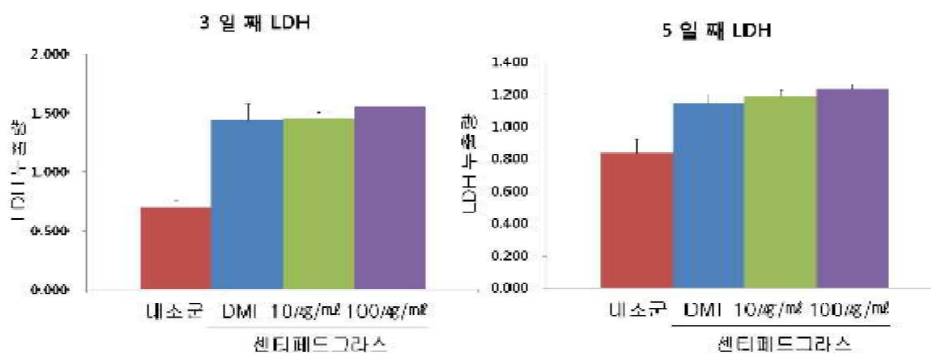
도면1



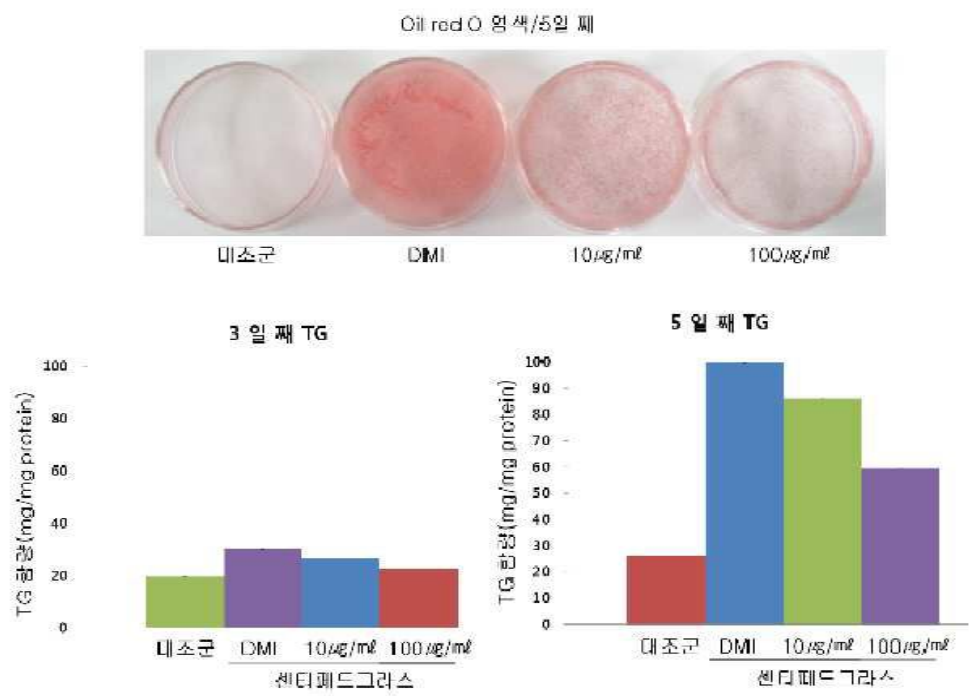
도면2



도면3



도면4



도면5

